

WO02068669

Publication Title:

**MATRIX ATTACHMENT REGIONS CONTAINING EPISOMAL VECTORS FOR
USE IN CELL-SPECIFIC GENE EXPRESSION**

Abstract:

Abstract of WO02068669

The invention relates to vectors that comprise at least one matrix attachment region and that f1f are suitable for the episomal introduction of nucleic acids into eukaryotic cells. The invention further relates to eukaryotic cells that contain said vectors and to the use of said vectors for the cell and/or tissue-specific expression of transgenes. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. September 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/068669 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/861, 5/10, A61K 48/00, A01K 67/027 (74) Anwalt: ACKERMANN, Joachim; Postfach 11 13 26, 60048 Frankfurt (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02031 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 26. Februar 2002 (26.02.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 09 780.8 28. Februar 2001 (28.02.2001) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): CARDION AG [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 15a, 40699 Erkrath (DE).
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): ZÄHRES, Holm [DE/DE]; Himmelgeister Strasse 77, 40225 Düsseldorf (DE). DREHER, Inge [DE/DE]; Gladbacher Strasse 10, 40219 Düsseldorf (DE). RÜDIGER, Manfred [DE/DE]; Kitzbühler Weg 34, 40789 Monheim (DE). MOLL, Thomas [DE/US]; App. C 109, 20 Chapel Street, Brookline, MA 02446 (US).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MATRIX ATTACHMENT REGIONS CONTAINING EPISOMAL VECTORS FOR USE IN CELL-SPECIFIC GENE EXPRESSION

(54) Bezeichnung: EPISOMALE VEKTOREN ENTHALTEND MATRIX-ANHEFTUNGSREGIONEN ZUR ZELLSPEZIFISCHEN GENEXPRESSION

(57) Abstract: The invention relates to vectors that comprise at least one matrix attachment region and that are suitable for the episomal introduction of nucleic acids into eukaryotic cells. The invention further relates to eukaryotic cells that contain said vectors and to the use of said vectors for the cell and/or tissue-specific expression of transgenes.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Vektoren, die mindestens eine Matrix-Anheftungsregion umfassen und zum episomalen Einbau von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen geeignet sind, eukaryotische Zellen, enthaltend diese Vektoren, sowie die Verwendung dieser Vektoren zur zell- und/oder gewebespezifischen Expression von Transgenen.



WO 02/068669 A2

Beschreibung

Episomale Vektoren enthaltend Matrix-Anheftungsregionen zur zellspezifischen Genexpression

Die Erfindung betrifft episomale Vektoren, umfassend mindestens eine Matrix-Anheftungsregion (MAR: *matrix-attachment-region*, SAR: *scaffold-attachment-region*, S/MAR) als genetischer Insulator, eukaryotische Zellen enthaltend diese Vektoren sowie die Verwendung dieser Vektoren zur Expression von Transgenen.

Zu den erfolgversprechenden Anwendungen der Gentechnologie zählt die Gentherapie, deren Ziel es ist, durch das Einschleußen von Erbgut in Zellen oder Gewebe des Menschen und dessen anschließender Expression Krankheiten, die auf ein defektes Gen zurückzuführen sind, zu behandeln oder zu verhindern. Zu diesem Zwecke sind mittlerweile zahlreiche Vektoren entwickelt worden, wobei man hinsichtlich des Einschleußens des Erbgutes virale von nicht-viralen Transferv Verfahren unterscheiden kann (Mulligan (1993), Science 260: 920). Als virale Vektoren kommen hierbei in erster Linie Retroviren und Adenoviren zum Einsatz.

Während die retrovirale Infektion zu einer stabilen Integration des genetischen Materials in das zelluläre Genom führt, liegen die Adenoviren in der Zelle episomal vor, werden also nicht stabil in das zelluläre Genom integriert.

Die Weiterentwicklung adenoviraler Vektoren für die somatische Gentherapie beinhaltet unter dem Aspekt der Sicherheit der Anwendung eine Verbesserung des *Targeting*, wobei man als wesentliche Targetingkonzepte den zellspezifischen Gentransfer und die zellspezifische Expression nennen kann.

Die Zellspezifität des Gentransfers kann man etwa durch Modifikation des Tropismus des Adenovirus durch Veränderung der Hüllproteine ermöglichen oder

verbessern, während die Zellspezifität der Transgenexpression durch Inkorporation zell- oder gewebespezifischer Promotoren (transcriptional targeting) ermöglicht oder verbessert werden kann.

- 5 Zellspezifische Promotoren, die in adenovirale Vektoren inkorporiert werden können, sind bereits bekannt. Ein grundlegendes Problem besteht jedoch darin, dass adenovirale Enhancerelemente mit diesen regulatorischen Modulen zur Transgenexpression interferieren können. Dies wurde insbesondere bei der Inkorporation zellspezifischer Promotoren und exogen regulierbarer Genschalter
10 beobachtet.

Adenovirale Enhancersequenzen, die mit der heterologen Transgenexpression interferieren können, befinden sich im adenoviralen ITR und der Verpackungsregion (Ad5 Sequenzen 1 bis 340). So hat der adenovirale ITR Bindungsstellen für eine
15 Reihe von Transkriptionsfaktoren (u.a SP1, ATF) (Hatfield et al. (1991), Virology 184: 265-76) und weist allein Enhanceraktivität auf (Miralles et al. (1989), J Biol Chem 264: 10763-72). Der E1A Enhancer überlappt mit den cis-aktiven Sequenzen für die Verpackung des viralen Genoms (Grable et al. (1992), J. Virol. 66: 723-31). Diese Verpackungssequenzen sind in allen beschriebenen adenoviralen Vektoren
20 einschließlich der *gutless* Vektoren (in der Literatur auch Hoch-Kapazitäts-Vektoren genannt) enthalten, so dass für keinen adenoviralen Vektor transkriptionelle Interferenzen ausgeschlossen werden können.

Ein Problem, das mit der Interferenz der adenoviralen Enhancersequenzen und der
25 heterologen Transgenexpression verbunden sein kann, ist, dass die Zellspezifität der eingebauten Promotoren verloren geht. Dies ist vor allem unter dem Aspekt der Sicherheit der Anwendung der adenoviralen Vektoren für die somatische Gentherapie unerwünscht.

- 30 Eine denkbare Vorgehensweise, diese unerwünschte Beeinflussung der Transgenexpression durch adenovirale Enhancersequenzen zu verhindern, besteht im Einsatz von Insulatoren.

Unter Insulatoren versteht man im allgemeinen DNA-Elemente, die integrierte

Reportergene vor chromosomalen Positionseffekten schützen, so dass die Transgene eine verringerte Positionsabhängigkeit der Genexpression zeigen, und / oder DNA-Elemente, die die Wirkung eines Enhancers auf einen stromabwärts liegenden Promotor reduzieren oder ganz verhindern.

5

Bei Verwendung von Vektoren zum stabilen Einbau von Nukleinsäuren in das Genom des Wirtes konnte die wirkungsvolle Verwendung von Matrix-Anheftungsregionen als Insulatoren nachgewiesen werden. So wurde für die MAR des Lysozymgens gezeigt, dass sie die Positionsabhängigkeit der Transgenexpression von stabilen Transfektanten in Zellen verschiedener Spezies (Ratte, Huhn) und unterschiedlicher Differenzierung (Makrophagen, Fibroblasten) und bei Kontrolle durch unterschiedliche Promotoren reduziert (Stief et al. (1989), Nature 341: 343-5; Phi-Van et al. (1990), Mol Cell Biol 10: 2302-7).

10

15

Die Insulation eines Promotors von der Aktivität eines Enhancers durch eine Matrix-Anheftungs-Region könnte hierbei an die Integration eines Konstruktes und den Aufbau einer vollständigen Domäne (mit Zusammenbau von Nucleosomen unter Einschluß von Histonen) geknüpft sein.

20

Bezüglich adenoviraler Vektoren sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich zwei adenovirale $\Delta E1$ -/ $\Delta E3$ -Vektoren beschrieben, die zur Verbesserung der Transgenexpression mit Insulatoren ausgestattet wurden. So beschreiben Vassaux et al. (1999) (Gene Ther. 6: 1192-7) die Tumorzell-spezifische Expression des ERBB2- Promotors durch Inkorporation des transkriptionellen Stop-Signals aus dem bovinen Wachstumshormon-Gen (bPA), wobei bPA eigentlich nicht zu den klassischen Insulatoren zu zählen ist.

25

Neuere Untersuchungen haben ferner für den HS-4 β -Globin-Insulator aus *G. gallus* gezeigt, dass dieser episomal und insbesondere in Adenoviren Insulatorfunktion aufweist. Recillas-Targa et al. konnten zeigen, dass für die Aktivität des HS-4 β -Globin Insulators eine Integration in das Genom – und damit vollständiger Aufbau der Chromatinstruktur – nicht notwendig ist (Recillas-Targa et al. (1999), Proc. Natl Acad Sci USA 96: 14354-9).

30

Steinwaerder und Lieber zeigten, dass durch seine Inkorporation hinter die adenovirale ITR eines adenoviralen $\Delta E1$ -/ $\Delta E3$ -Vektoren die Induzierbarkeit des Metall-responsiven Promotors MRE in vitro und in vivo verbessert wird (Steinwaerder und Lieber (2000), Gene Ther. 7, 556-67).

5

Burcin et al. (1999) konnten mit dem HS-4 Insulator eine verbesserte Induzierbarkeit eines Mifepriston-abhängigen Genschalters in einem adenoviralen *gutless* Vektor in vitro beobachten, während in vivo, in einem Mausmodell, die absoluten Expressionshöhen der adenoviralen Vektoren mit HS-4 Insulator reduziert waren (Burcin et al. (1999), Proc Natl Acad Sci USA 96: 355-60).

10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, alternative Möglichkeiten zur Insulation von episomal in Zellen vorliegendem genetischen Material bereitzustellen, wofür angesichts der Anwendungsmöglichkeiten von episomalen Nukleinsäuren in der

15

Gentherapie ein dringender Bedarf besteht.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, zu verhindern, dass es beim Einbau von Nukleinsäuren, die Zell-spezifische Promotoren umfassen und episomal in eukaryotische Zellen eingebaut werden, zum Verlust der Zell-Spezifität des

20

Promotors kommt, wofür unter dem Aspekt der Sicherheit der Anwendung in der Gentherapie ein dringender Bedarf besteht.

Es zeigte sich nun überraschenderweise, dass Matrix-Anheftungsregionen in episomal in eukaryotische Zellen eingebauten Nukleinsäuren Insulatorfunktion ausüben. Überraschenderweise scheinen also Matrix-Anheftungsregionen cis-aktiv auf episomale DNA zu wirken, ohne dass der Aufbau einer vollständiger Chromatinorganisation – wie sie im Falle einer Integration der Nukleinsäure ins Genom vorläge – für die Insulatorfunktion unbedingt notwendig ist. Eine Quasi-Chromatin- bzw. Histone einschließende Nukleosomen-Struktur (Daniell et al.

25

30

könnte hierbei wichtig für die Ausübung der Insulatorfunktion der Matrix-Anheftungsregion sein.

Ferner zeigte sich überraschenderweise, dass bei Vorlage von Zell-spezifischen

Promotoren unter Verwendung von Matrix-Anheftungsregionen sichergestellt werden kann, dass die Zell-Spezifität des Promotors erhalten bleibt.

Weiterhin zeigte sich überraschenderweise, dass durch den Einbau der Matrix-Anheftungsregionen die Expressionsdauer des eingebauten Vektors in einem replizierenden Zellsystem deutlich höher ist als ohne Einbau der Matrix-Anheftungsregion, der so erhaltene Vektor also eine verbesserte Expressionspersistenz besitzt.

Der Gedanke, Matrix-Anheftungsregionen in episomale Vektoren einzubauen, wurde bereits von Sandig et al. (1997) ausgesprochen, wobei dieser allerdings nicht angibt, aus welchen Gründen die Matrix-Anheftungsregion in den episomalen Vektor eingebaut werden soll, und weiterhin offensichtlich von diesem auch keine Experimente in dieser Hinsicht durchgeführt worden sind (WO 97/04117).

Weiterhin wurde von Zaehres et al. (2000) beschrieben, dass durch Einbau einer Matrix-Anheftungsregion in episomale Vektoren die Expression eines Transgens in Zellkultur verlängert werden kann. Allerdings werden hier weder die verwendeten Zellen noch der Einbauort der Matrix-Anheftungsregion in den episomalen Vektor angegeben, so daß keine für den Fachmann ausführbare Offenbarung vorliegt. Insbesondere ist auch eine Insulator-Wirkung der Matrix-Anheftungsregion bei Zaehres et al. nicht beschrieben und für den Fachmann auch nicht naheliegend (Zaehres et al. (2000), J Gene Med 2 (5 Suppl): 57).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Vektoren, die zum episomalen Einbau von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen verwendet werden können und die sich dadurch auszeichnen, dass sie mindestens eine Matrix-Anheftungsregion umfassen, wobei die Matrix-Anheftungsregion vorzugsweise Insulatorfunktion in Bezug auf in diesen Vektoren enthaltenen und/oder in diese Vektoren einbaubare Promotoren besitzt.

Unter Verwendung von molekularbiologischen Standardmethoden kann man in die erfindungsgemäßen Vektoren eine Nukleinsäure einbauen, die einen Promotor und eine Transgensequenz umfasst. Die so erhältlichen Vektoren sind ebenfalls

Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren sind durch Infektion und/oder Transfektion eukaryotische Zellen erhältlich, die eine Nukleinsäure episomal enthalten,
5 die eine Matrix-Anheftungsregion sowie gegebenenfalls einen Promotor und ein Transgen umfasst, wobei der Promotor von der Matrix-Anheftungsregion insuliert wird und vorzugsweise die Expression des Transgens reguliert.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb eukaryotische Zellen,
10 enthaltend eine episomale Nukleinsäure, wobei die episomale Nukleinsäure eine MAR und vorzugsweise einen Promotor und ein Transgen umfasst, wobei die Expression des Transgens bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors steht, sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser eukaryotischen Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektors die erfindungsgemäßen
15 eukaryotischen Zellen hergestellt werden, wobei der Einbau der episomalen Nukleinsäure erfindungsgemäß bevorzugt durch Infektion oder Transfektion der eukaryotischen Zellen mit dem erfindungsgemäßen Vektor erfolgt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls die Verwendung der
20 erfindungsgemäßen Vektoren zur Herstellung von eukaryotischen Expressionssystemen, insbesondere zur Herstellung von Expressionssystemen mit einer verbesserten Expressionspersistenz.

Die erfindungsgemäßen Vektoren und/oder eukaryotischen Zellen werden
25 erfindungsgemäß bevorzugt als Therapeutikum und/oder Diagnostikum eingesetzt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit weiterhin eine Zusammensetzung, enthaltend einen der erfindungsgemäßen Vektoren und/oder erfindungsgemäße eukaryotische Zellen und gegebenenfalls weitere Hilfs- und Zusatzstoffe, sowie die
30 Verwendung dieser Vektoren und/oder eukaryotischen Zellen zur Herstellung einer Zusammensetzung, wobei es sich bei der Zusammensetzung bevorzugt um ein Therapeutikum oder ein Diagnostikum handelt.

Besonders bevorzugt handelt es sich erfindungsgemäß um ein Therapeutikum und/oder Diagnostikum zum Einsatz in der Gen- und/oder Zelltherapie und/oder zur Behandlung von chronischen Krankheiten und/oder Erbkrankheiten und/oder akuten Krankheiten wie Diabetes, Hämophilie, ADA, Muskeldystrophie, familiäre
5 Hypercholesterinämie, Rheuma, kardiovaskulären Erkrankungen – Arteriosklerose oder deren Folgekrankheiten (Stenose, Restenose, Herzinfarkt), Tumorerkrankungen, Infektionserkrankungen sowie neurologischen Erkrankungen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein therapeutisches und/oder
10 gentherapeutisches Verfahren, insbesondere ein solches zur Behandlung der zuvor genannten Krankheiten.

Das sich im Vektor befindliche Transgen, das unter der Kontrolle des insulierten Promotors steht, umfasst erfindungsgemäß beispielsweise eine Nukleinsäure
15 kodierend für Insulin, Blutgerinnungsfaktor VIII oder X, eine Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthase (z.B. iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; nNOS: neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase), Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, M-CSF oder MCP-1 oder Transkriptionsfaktoren wie die Gruppen der Homeo-domain Faktoren wie Nkx, POU
20 oder Pax Faktoren oder Helix-loop-helix Faktoren wie die myogenen Faktoren, die Zellen in ihrem Differenzierungs- und Reifungsprozeß beeinflussen könnten.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren für die Zell- und/oder Gewebe-spezifische Expression eines Transgens.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist hierbei insbesondere ein Verfahren zur Zell-spezifischen Expression einer episomalen Nukleinsäure, das sich dadurch
25 auszeichnet, dass nach Infektion oder Transfektion mit einem erfindungsgemäßen Vektor die episomale Nukleinsäure in den infizierten oder transfizierten Zellen exprimiert wird.
30

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind transgene Säugetiere außer dem Menschen, die einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Differenzierung und/oder Selektion von Stammzellen, insbesondere ein solches, bei dem ein erfindungsgemäßer Vektor durch Transfektion und/oder Infektion in die Stammzellen eingebracht wird und die transfizierten und/oder infizierten Zellen gegebenenfalls von den anderen Zellen
5 getrennt werden. In einer besonderen Ausführungsform dieses Verfahrens wird hierbei ein erfindungsgemäßer Vektor, der mindestens ein Transgen umfasst, das den Differenzierungsstatus der Stammzellen beeinflusst, in die Stammzellen eingebracht.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Differenzierung und/oder Selektion von Stammzellen, dadurch gekennzeichnet, dass Stammzellen, die
10 einen erfindungsgemäßen Vektor umfassen, mit den dem Fachmann bekannten Methoden aus transgenen Tieren oder deren Embryonen isoliert werden.

Die aus diesen Stammzellen differenzierten Zellen können zur zellvermittelten
15 Transplantation und für den somatischen Gentransfer in vivo eingesetzt werden.

Weiter Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektor oder einer erfindungsgemäßen Zelle zur Identifizierung und Validierung genomischer Targets und/oder zum Drug Screening, insbesondere im
20 Rahmen von Pharmacogenomics - Anwendungen.

Bei den erfindungsgemäßen Vektoren, die eine Matrix-Anheftungsregion umfassen, handelt es sich bevorzugt um adenovirale Vektoren, besonders bevorzugt um adenovirale $\Delta E1$ -/ $\Delta E3$ -Vektoren oder adenovirale gutless- bzw. Hochkapazitäts-
25 Vektoren, insbesondere handelt es sich um den adenoviralen Vektor *pAd-SAR1-X* / *pASX* gemäß SEQ ID 1, der als Basisvektor zur Konstruktion unterschiedlicher adenoviraler Vektoren verwendet werden kann.

Matrix-Anheftungsregionen sind dem Fachmann bekannt. Unter Matrix-
30 Anheftungsregionen wird erfindungsgemäß insbesondere auch verstanden, was im englischen Sprachgebrauch unter „scaffold attachment regions“ bekannt ist.

Die Matrix-Anheftungsregion wird erfindungsgemäß mit den dem Fachmann bekannten molekularbiologischen Methoden in den episomalen Vektor eingebaut. Bei

Verwendung von adenoviralen Vektoren erfolgt der Einbau hierbei bevorzugt stromabwärts (in 3'-Richtung) von den adenoviralen Verpackungs- und Enhancersequenzen, die beispielsweise bei dem adenoviralen Vektor pd1E1Sp1A von Position 1 bis 360 lokalisiert sind, sowie stromaufwärts (in 5'-Richtung) von der Position, an der sich der zu insulierende Promotor befindet oder an der der zu insulierende Promotor mit molekularbiologischen Standardmethoden eingebaut werden kann.

Die Matrix-Anheftungsregion wird hierbei bevorzugt so eingebaut, dass sich der Promotor bzw. der einzubauende Promotor unmittelbar an das 3'-Ende der Matrix-Anheftungsregion anschließt oder maximal 1000 Baseneinheiten vom 3'-Ende der Matrix-Anheftungsregion entfernt ist, und/oder so, dass sich die Verpackungsregion des adenoviralen Vektors unmittelbar an das 5'-Ende der Matrixanheftungsregion anschließt oder maximal 1000 Baseneinheiten vom 5'-Ende der Matrixanheftungsregion entfernt ist.

Optional kann zusätzlich eine zweite Matrix-Anheftungsregion stromabwärts (3') vom internen, Zell-spezifischen Promotor eingebaut werden.

Als Promotor wird erfindungsgemäß bevorzugt ein Zell- oder Gewebe-spezifischer Promotor verwendet, besonders bevorzugt ein Endothelzell-spezifischer Promotor, insbesondere ein Promotor des VE-Cadherin 1 oder 2 oder des VEGF-Rezeptors (FLT-1, KDR/FLK-1), ein Cardiomyocyten-spezifischer Promotor, insbesondere der *cardiac myosin light chain (MLC) 2* Gen -Promotor oder der *cardiac myosin heavy chain (MHC)* Gen -Promotor, ein für glatte Muskelzellen spezifischer Promotor, insbesondere der *smooth muscle alpha-actin* -Promotor, oder ein für Pankreas/ β -Zellen spezifischer Promotor, insbesondere der Insulin-, PDX-, NKx- oder Beta2-Promotor. Der Promotor ist erfindungsgemäß bevorzugt durch eine Matrix-Anheftungsregion insuliert.

Die Matrix-Anheftungsregion hat erfindungsgemäß bevorzugt eine Basenlänge zwischen 500 und 5000, besonders bevorzugt zwischen 1000 und 3000, ganz besonders bevorzugt zwischen 1500 und 2500, insbesondere eine Basenlänge von etwa 2000 Baseneinheiten.

Bei der Matrix-Anheftungsregion handelt es sich beispielsweise um eine Matrix-Anheftungsregion aus Wirbeltieren, insbesondere aus Säugern, besonders bevorzugt handelt es sich um eine humane Matrix-Anheftungsregion, insbesondere um diejenige des humanen Interferon β -Locus. Die Matrix-Anheftungsregion fungiert
5 erfindungsgemäß bevorzugt als Insulator.

Die Matrix-Anheftungsregion kann erfindungsgemäß sowohl in 5'-3'- als auch in 3'-5'-Richtung in den episomalen Vektor eingebaut werden.

- 10 Bei den eukaryotischen Zellen handelt es sich erfindungsgemäß bevorzugt um Zellen von Wirbeltieren, insbesondere um Säuger-Zellen, besonders bevorzugt um menschliche Zellen und/oder um Endothel-Zellen, Cardiomyocyten, glatte Muskelzellen oder um Pankreas/ β -Zellen.
- 15 In den folgenden Ausführungsbeispielen wird die Erfindung beispielhaft veranschaulicht.

Abbildungen

- 20 In Figur 1 ist die Expression der Deletionskonstrukte des humanen VE-Cadherin1 Promotors mit Luciferase als Reportergen in Endothelzellen (BAEC) und, als Vergleich, in Fibroblasten (NIH3T3) dargestellt.

- In Figur 2 ist der erfindungsgemäße adenovirale shuttle Vektor pAd-SAR1-x / pASX
25 (8401 bp) schematisch dargestellt. Er setzt sich zusammen aus der Sequenz des adenoviralen shuttle Vektors pd1E1Sp1A (6409 bp) (Bett et al. PNAS 91: 8802-8806, 1994) (Sequenz 1-364), der Sequenz der humanen Interferon β – Scaffold-Attachment-Region (SAR) (NCBI-Nukleotid-Datenbank Nr.: M83137) (Sequenz 218-2201 + Sequenz AATT) und der Sequenz des adenoviralen shuttle Vektors
30 pd1E1Sp1A (Sequenz 361-6409). Dem adenoviralen Inverted Terminal Repeat (ITR) folgt die adenovirale Verpackungsregion (Ψ), an diese schließt sich die Matrix-Anheftungsregion an, der eine multiple Klonierungsstelle (MCS) folgt, in die erfindungsgemäß eine Nukleinsäure eingebaut werden kann, die einen Promotor und ein Transgen umfasst. Die vollständige Sequenz des Vektors pAd-SAR1-x /

pASX ist im Sequenzprotokoll als SEQ ID No. 1 angegeben.

In Figur 3 sind die Vektoren Ad-VE1-lacZ und Ad-SAR1-VE1-lacZ schematisch dargestellt.

5

In Fig. 4 sind die Ergebnisse der Expressionsstudien mit den adenoviralen Vektoren Ad-SAR1-VE1-lacZ und Ad-VE1-lacZ sowie Ad-CMV-GFP nach Transduktion (MOI 50) von Endothelzellen (HUVEC) und glatten Muskelzellen (SMC) dargestellt (β -GAL: relative Luminiszenzaktivität; Mittelwert \pm Standardabweichung; n=4).

10

Ausführungsbeispiele

1.) Deletionskonstrukte des humanen VE-Cadherin1 Promotors mit Luciferase als Reporter gen zeigen in vitro Endothelzell-spezifische Expression

15

In Vorexperimenten wurde der humane VE-Cadherin1 Promotor (hVE1) aus einer humanen BAC (bacterial artificial chromosome) – Bibliothek mittels einer Sonde aus dem murinen VE-Cadherin 1 Promotor (NCBI-Nr. A91715 - Sequenz aus Patent WO9824892) kloniert. Mit diesem Promoter wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt: Verschiedene Promotorfragmente von $-145bp$ bis $-3440 bp$ stromaufwärts vom hVE1-Transkriptionsstartpunkt wurden mit einem Luciferase-Reporter gen (pGL3basic Vektor, Promega Inc., Madison, Wisconsin) gekoppelt. Diese Reporter genkonstrukte wurden in a.) Endothelzelllinien (BAEC (von CellSystems GmbH, D-53562 St. Katharinen, Katalog Nr. BW-6001)) und in b.) Zellen nicht endothelialen Ursprungs (NIH3T3 – Fibroblasten (von DSMZ GmbH, D-38124 Braunschweig, DSMZ No. ACC 59)) transfiziert (Transfektionsagens: ExGen 500, MBI Fermentas GmbH, D-68789 St. Leon-Rot). In diesen Experimenten zeigten alle untersuchten Promotorfragmente eine endothelspezifische Expression: In den Endothelzelllinien lag die Luciferaseaktivität der Reporter genkonstrukte 70-110fach über dem Hintergrund, in den NIH3T3 wurden lediglich Aktivitäten bis zu 10fach über dem Hintergrund gemessen (Figur 1).

20

25

30

2) Adenovirale Vektoren mit dem humanen VE-Cadherin1 Promotor zeigen keine Endothelzell-spezifische Expression

Zur Konstruktion des adenoviralen Vektors *Ad-VE1-lacZ* (Figur 3) wurde das –3440
5 *bp* hVE-Cadherin1 Promotor Fragment, das in den Transfektionsexperimenten Endothelzell-spezifische Expression zeigte, vor dem *E. coli lacZ* Gen in die EcoRV Schnittstelle von pΔE1Asp1A (Microbix Inc., Ontario, Kanada) inseriert. Dieses *shuttle* Plasmid wurde mit pBHG10 (Microbix Inc., Ontario, Kanada) in die Produktionszelllinie 293 (ATCC Nr. CRL-1573) kotransfiziert. Es wurden
10 rekombinante Adenoviren mit Virustitern um 10^{10} generiert.

Zur Analyse der zellspezifischen Expression von *Ad-VE1-lacZ* wurden humane Endothelzellen (HUVEC (von Cell Systems GmbH, D-53562 St. Katharinen, Katalog Nr. CC-2517)) und porcine glatte Muskelzellen (SMC (von Cell Systems GmbH, D-53562 St. Katharinen)) mit dem Vektor sowie als weiterer Kontrolle dem Vektor *Ad-*
15 *CMV-GFP* in einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 50 für zwei Stunden in DMEM-Medium (Life Technologies, Invitrogen) mit 2% FCS (Life Technologies, Invitrogen) infiziert.

Drei Tage nach der Infektion wurden Zellextrakte aufbereitet und die β -Galaktosidaseaktivität (Galacto-Star, Tropix Inc., PE Biosystems, Bedford,
20 Massachusetts) sowie der Proteingehalt der Zellextrakte (BCA Protein Assay, PIERCE Inc., Illinois) bestimmt.

Der Vektor *Ad-VE1-lacZ* exprimierte sowohl in den Endothelzellen als auch in den glatten Muskelzellen gleichermaßen stark (Figur 4). Die Expression vom hVE-Cadherin1 Promotor ist in diesem Kontext also nicht Endothelzell-spezifisch.

25 Auch adenovirale gutless Vektoren mit einem humanen VE-Cadherin 1 Promoterfragment zeigten keine Endothelzell-spezifische Expression.

3.) Wiederherstellung der Zell-Spezifität durch Inkorporation der Matrix-Anheftungsregion in den adenoviralen Vektor Ad-SAR1-VE1-lacZ

30 Zur Konstruktion des adenoviralen Vektors *Ad-SAR1-VE1-lacZ* (Figur 3) wurde das –700bp hVE-Cadherin1 Promotor – Fragment vor dem *E. coli lacZ* Gen in die EcoRV Schnittstelle von pAd-SAR1-x inseriert. Dieses *shuttle* Plasmid wurde mit dem Plasmid pJM17 (Microbix, Ontario, Kanada) in die Produktionszelllinie 293

(ATCC Nr. CRL-1573) kotransfiziert. Es wurden rekombinante Adenoviren mit Virustitern um 10^{10} generiert.

Zur Analyse der zellspezifischen Expression von Ad-SAR1-VE1-lacZ wurden humane Endothelzellen (HUVEC (von Cell Systems GmbH, D-53562 St. Katharinen, Katalog Nr. CC-2517)) und porcine glatte Muskelzellen (SMC (von Cell Systems GmbH, D-53562 St. Katharinen)) mit diesem Vektor sowie als weiterer Kontrolle mit dem Vektor Ad-CMV-GFP in einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 50 für zwei Stunden in DMEM-Medium (Life Technologies, Invitrogen) mit 2% FCS (Life Technologies, Invitrogen) infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden Zellextrakte aufbereitet und die β -Galaktosidaseaktivität (Galacto-Star, Tropix Inc., PE Biosystems, Bedford, Massachusetts) sowie der Proteingehalt der Zellextrakte (BCA Protein Assay, PIERCE Inc., Illinois) bestimmt.

Der Vektor Ad-SAR1-VE1-lacZ exprimierte in Endothelzellen, die Expression in den glatten Muskelzellen war deutlich reduziert (Figur 4). Dieses Resultat konnte in mehreren Experimenten und auch durch morphologische Betrachtung transduzierter und β -Gal gefärbter Zellen beobachtet werden. In Kombination mit dem S/MAR-Modul war vom hVE-Cadherin1 Promotor eine verbesserte Endothelzell-spezifische Expression im adenoviralen Vektor möglich.

1. Vektor zum episomalen Einbau von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass er mindestens eine Matrix-Anheftungsregion umfasst.
2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen adenoviralen Vektor handelt.
3. Vektor nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Matrix-Anheftungsregion um eine humane Matrix-Anheftungsregion handelt.
4. Vektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um den Vektor pAD-SAR1-X/pASX gemäß SEQ ID No. 1 handelt.
5. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass er zusätzlich mindestens eine Nukleinsäure umfasst, die einen Promotor und ein Transgen enthält.
6. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass sich die Matrix-Anheftungsregion in 5'-Richtung vom Promotor und in 3'-Richtung von der viralen Verpackungsregion befindet.
7. Vektor nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Abstände zwischen 3'-Ende der Verpackungsregion und 5'-Ende der Matrix-Anheftungsregion sowie 3'-Ende der Matrix-Anheftungsregion und 5'-Ende des Promotors jeweils nicht mehr als 1000 Baseneinheiten betragen.
8. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix-Anheftungsregion den Promotor insuliert.
9. Vektor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Matrix-Anheftungsregion eine Basenlänge zwischen 500 und 5000

Baseneinheiten besitzt.

10. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass er einen Gewebe- oder Zell-spezifischen Promotor umfasst.

5

11. Vektor nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Promotor um einen Endothelzell-spezifischen Promotor handelt.

12. Vektor nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um den Vektor Ad-SAR1-VE1-lacZ handelt.

10

13. Eukaryotische Zelle, enthaltend einen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 12.

15

14. Eukaryotische Zelle, enthaltend eine episomal vorliegende Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine Matrix-Anheftungsregion umfasst.

15. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder eukaryotische Zelle nach einem der Ansprüche 13 oder 14 als Therapeutikum.

20

16. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder eukaryotische Zelle nach einem der Ansprüche 13 oder 14 als Diagnostikum.

25

17. Zusammensetzung, enthaltend mindestens einen Vektor gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 und/oder eine Zelle nach einem der Ansprüche 13 oder 14 sowie gegebenenfalls weitere Hilfs- und Zusatzstoffe.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zusammensetzung um ein Therapeutikum handelt.

30

19. Zusammensetzung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Zusammensetzung um ein Diagnostikum handelt.

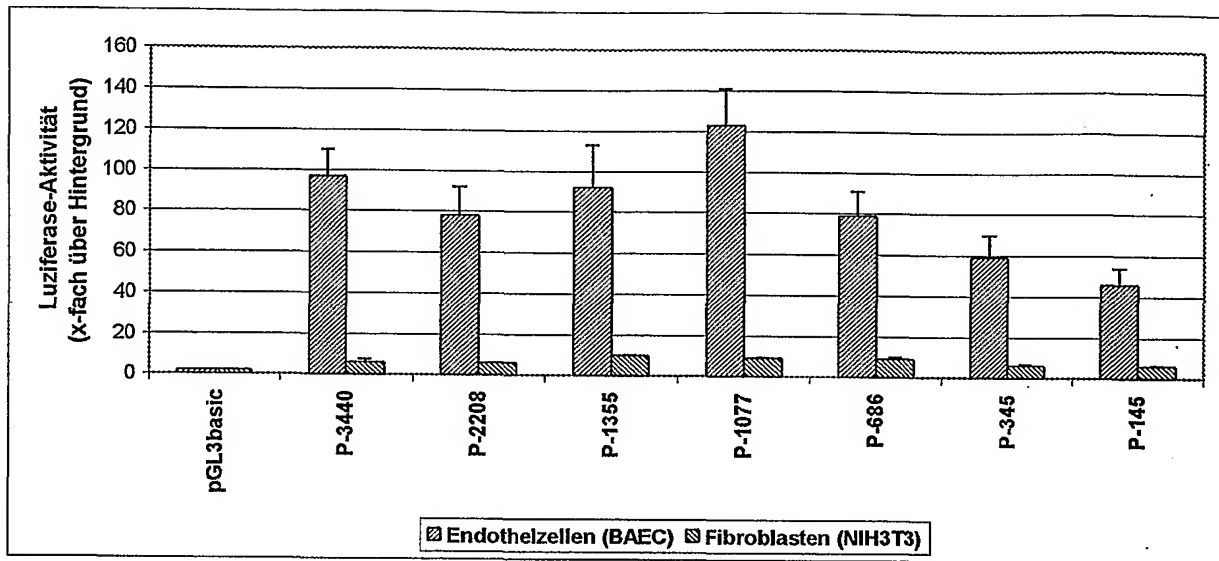
20. Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 18 oder 19 zur Behandlung oder Diagnose einer der folgenden Krankheiten: Diabetes, Hämophilie, ADA, Muskeldystrophie, familiäre Hypercholesterinämie, Rheuma, kardiovaskuläre Erkrankungen – Arteriosklerose oder deren Folgekrankheiten (Stenose, Restenose, Herzinfarkt), Tumorerkrankungen, Infektionserkrankungen sowie neurologische Erkrankungen.
21. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und/oder einer Zelle nach einem der Ansprüche 13 oder 14 zur Herstellung eines Therapeutikums.
22. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und/oder einer Zelle nach einem der Ansprüche 13 oder 14 zur Herstellung eines Diagnostikums.
23. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Herstellung eines eukaryotischen Expressionssystems.
24. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Gewebe- oder Zell-spezifischen Expression eines Transgens.
25. Verfahren zur Gewebe- oder Zell-spezifischen Expression einer episomalen Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass Zellen mit einem Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 12 infiziert und/oder transfiziert werden und die episomale Nukleinsäure anschließend exprimiert wird.
26. Verwendung eines Vektors gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 und/oder einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14 in der Gen- und/oder Zelltherapie.
27. Transgene Säugetiere außer dem Menschen, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und/oder eine Zelle nach einem der Ansprüche 13 oder 14 enthalten.

28. Verfahren zur Differenzierung und/oder Selektion von Stamm- und Vorläuferzellen, dadurch gekennzeichnet, dass ein Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 12 durch Transfektion und/oder Infektion in die Stammzellen eingebracht wird und die transfizierten und/oder infizierten Zellen gegebenenfalls von den anderen Zellen getrennt werden.

29. Verfahren zur Differenzierung und/oder Selektion von Stamm- und Vorläuferzellen, dadurch gekennzeichnet, dass Stammzellen, die einen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 12 umfassen, aus transgenen Tieren oder deren Embryonen isoliert werden.

30. Verwendung eines Vektors gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 und/oder einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14 und/oder eines Verfahrens nach den Ansprüchen 28 und 29 zur Identifizierung und/oder Validierung genomischer Targets und/oder zum Drug Screening.

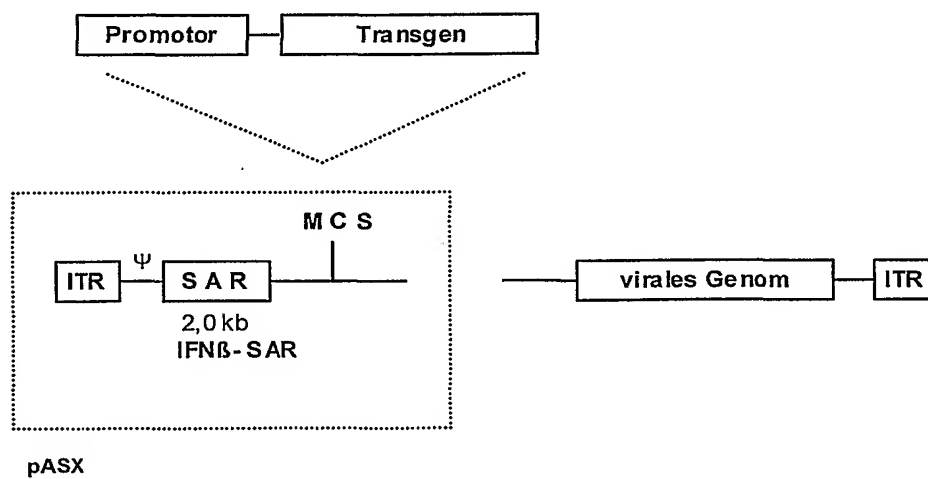
Figur 1



Figur 2

Adenoviraler shuttle Vektor pAd-SAR1-x / pASX

(ITR: adenoviraler *Inverted Terminal Repeat* / Ψ : adenovirale Verpackungsregion / MCS: Multiple Klonierungsstelle
 SAR: humane Interferon β *Scaffold-Attachment-Region*)

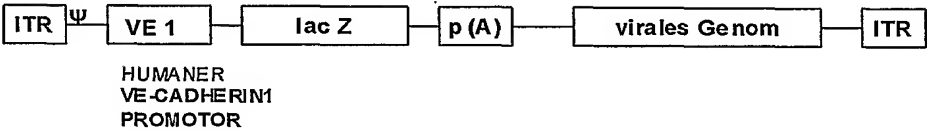


Figur 3

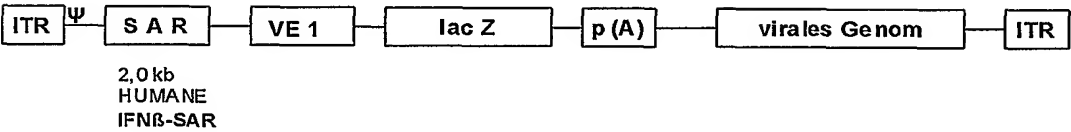
Adenovirale Vektoren Ad-VE1-lacZ und Ad-SAR1-VE1-lacZ

(Ψ : adenovirale Verpackungsregion)

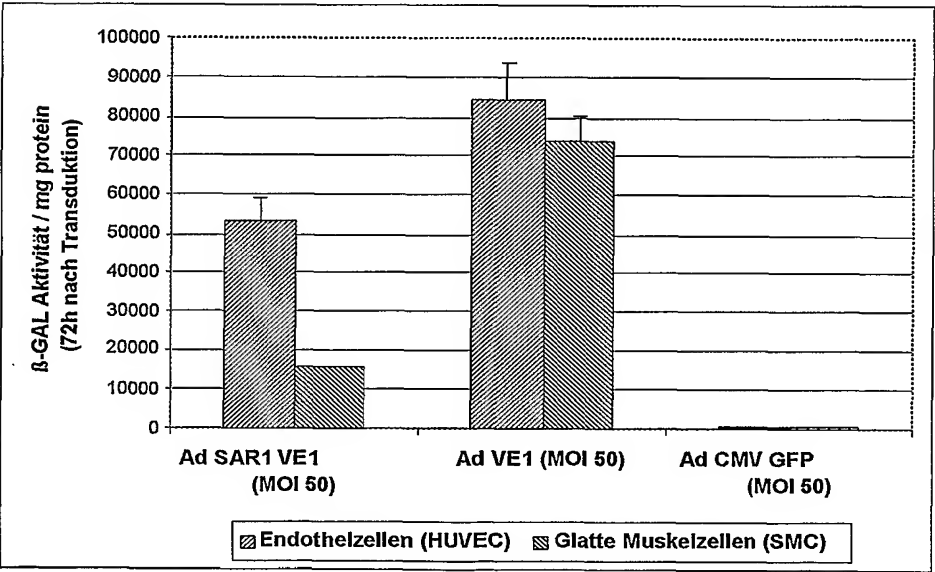
Ad - VE1 - lacZ



Ad - SAR1 - VE1 - lacZ



Figur 4



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Cardion AG

<120> Episomale Vektoren enthaltend Matrix-Anheftungsregionen
zur zellspezifischen Genexpression

<130> 201ca03

<140>

<141>

<150> DE10109780.8

<151> 2001-02-28

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 8401

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: adenoviraler
Vektor

<400> 1

```

tcccttccag ctctctgccc cttttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120
gatgttgcaa gtgtggcgga acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180
gtgtgcgccg gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gttttaggcg gatgtttag 240
taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300
agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tctctagcat cgatgtcgag 360
gatcgatcta aataaaactta taaattgtga gagaaattaa tgaatgtcta agttaatgca 420
gaaacggaga gacatactat attcatgaac taaaagactt aatattgtga aggtatactt 480
tcttttcaca taaatttcta gtcaatatgt tcaccccaaa aaagctgttt gtttaacttgt 540
caacctcatt tcaaaatgta tatagaaagc ccaaagacaa taacaaaaat attctttag 600
aacaaaatgg gaaagaatgt tccactaaat atcaagattt agagcaaagc atgagatgtg 660
tggggataga cagtgaggct gataaaatag agtagagctc agaaacagac ccattgatat 720
atgtaagtga cctatgaaaa aaatatggca ttttacaatg ggaaaatgat gatctttttc 780
tttttttagaa aaacagggaa atatatattat atgtaaaaaa taaaaggga cccatatgtc 840
ataccataca cacaaaaaaa ttccagtga ttataagtct aaatggagaa ggcaaaactt 900
taaattcttt agaaaataat atagaagcat gccatcatga cttcagtgtg gagaaaaatt 960
tcttatgact caaagtccta accacaaaga aaagattgtt aattagattg catgaatatt 1020
aagacttatt tttaaaatta aaaaaccatt aagaaaagtc aggccataga atgacagaaa 1080
atatttgcaa caccocagta aagagaattg taatatgcag attataaaaa gaagtcttac 1140

```

aatcagtaa	aaaataaaac	tagacaaaaa	tttgaacaga	tgaaagagaa	actctaaata	1200
atcattacac	atgagaaaact	caatctcaga	aatcagagaa	ctatcattgc	atatacacta	1260
aattagagaa	atattaaaaag	gctaagtaac	atctgtggca	atattgatgg	tatataacct	1320
tgatatgatg	tgatgagaac	agtactttac	cccatgggct	tcctcccaa	acccttacc	1380
cagtataaat	catgacaaat	atacttttaa	aaccattacc	ctatatctaa	ccagtactcc	1440
tcaaaaactgt	caagggtcatc	aaaaataaga	aaagtctgag	gaactgtcaa	aactaagagg	1500
aaccaagga	gacatgagaa	ttatatgtaa	tgtggcattc	tgaatgagat	cccagaacag	1560
aaaaagaaca	gtagctaaaa	aactaatgaa	atataaataa	agtttgaact	ttagtttttt	1620
ttaaaaaaga	gtagcattaa	cacggcaaag	tcattttcat	atttttcttg	aacattaagt	1680
acaagtctat	aattaaaaat	tttttaaatg	tagtctggaa	cattgccaga	aacagaagta	1740
cagcagctat	ctgtgctgtc	gcctaactat	ccatagctga	ttggtctaaa	atgagataca	1800
tcaacgctcc	tccatgtttt	ttgttttctt	tttaaatgaa	aaactttatt	ttttaagagg	1860
agtttcaggt	tcatagcaaa	attgagagga	aggtacattc	aagctgagga	agttttctct	1920
tattcctagt	ttactgagag	attgcatcat	gaatgggtgt	taaattttgt	caaagtcttt	1980
ttctgtgtct	atcaatatga	ccatgtgatt	ttcttcttta	acctgttgat	gggacaaatt	2040
acgttaattg	attttcaaac	gttgaaccac	ccttacatat	ctggaataaa	ttctacttgg	2100
ttgtggtgta	tattttttga	tacattcttg	gattcttttt	gctaataatt	tgttgaaaat	2160
gtttgtatct	ttgttcatga	gagatattgg	tctgttgttt	tcttttcttg	taatgtcatt	2220
ttctagttcc	ggtattaagg	taatgctggc	ctagttgaat	gatttaggaa	gtattccctc	2280
tgcttctgtc	ttctgaaaga	gattgtagaa	agttgataca	attttttttt	ctttaaatat	2340
cttgatagaa	ttgatccctc	gagtctagag	atatcgaatt	caagcttgct	gactcgaaga	2400
tctgggcgtg	gttaaggggtg	ggaaagaata	tataaggtgg	gggtcttatg	tagttttgta	2460
tctgttttgc	agcagccgcc	gccgccatga	gcaccaactc	gtttgatgga	agcattgtga	2520
gctcatattt	gacaacgcgc	atgcccccat	gggcccgggt	gcgtcagaat	gtgatgggct	2580
ccagcattga	tggtgcgcc	gtcctgcccg	caaactctac	taccttgacc	tacgagaccg	2640
tgtctggaac	gocgttggag	actgcagcct	ccgcgcgcgc	ttcagccgct	gcagccaccg	2700
ccgcgcggat	tgtgactgac	tttgctttcc	tgagcccgct	tgcaagcagt	gcagcttccc	2760
gttcatccgc	ccgcgatgac	aagttgacgg	ctcttttggc	acaattggat	tctttgaccc	2820
gggaacttaa	tgtcgtttct	cagcagctgt	tggatctgcg	ccagcagggt	tctgccctga	2880
aggcttccct	ccctcccaat	gcggtttaaa	acataaataa	aaaaccagac	tctgtttgga	2940
tttgatcaa	gcaagtgtct	tgctgtcttt	atttaggggt	tttgccgcgcg	cggtaggccc	3000
gggaccagcg	gtctcggtcg	ttgagggtcc	tgtgtatttt	ttccaggacg	tggtaaagggt	3060
gactctggat	gttcagatac	atgggcataa	gccgctctct	ggggtggagg	tagcaccact	3120
gcagagcttc	atgctgcggg	gtggtgttgt	agatgatcca	gtcgtagcag	gagcgtggg	3180
cgtggtgcct	aaaaatgtct	ttcagtagca	agctgattgc	caggggcagg	cccttgggtgt	3240
aagtgtttac	aaagcgggta	agctgggatg	ggtgcatacg	tggggatatg	agatgcattct	3300
tggactgtat	tttttaggttg	gctatgttcc	cagccatatc	cctccgggga	ttcatgttgt	3360
gcagaaccac	cagcacagtg	tatccgggtgc	acttgggaaa	tttgtcatgt	agcttagaag	3420
gaaatgcgtg	gaagaacttg	gagacgccct	tgtgacctcc	aagattttcc	atgcattcgt	3480
ccataatgat	ggcaatgggc	ccacgggcgg	cggcctgggc	gaagatatatt	ctgggatcac	3540
taacgtcata	gttgtgttcc	aggatgagat	cgtcataggc	cattttttaca	aagcgcgggc	3600
ggagggtgcc	agactgcggg	ataatgggtc	catccggccc	aggggcgtag	ttacctcac	3660
agatttgcat	ttcccacgct	ttgagttcag	atgggggat	catgtctacc	tgcggggcga	3720
tgaagaaaac	ggtttccggg	gtaggggaga	tcagctggga	agaaagcagg	ttcctgagca	3780
gctgcgactt	accgcagccg	gtgggcccgt	aatcacacc	tattaccggg	tgcaactgggt	3840
agttaagaga	gctgcagctg	ccgtcatccc	tgagcagggg	ggccacttcg	ttaagcatgt	3900
ccctgactcg	catgttttcc	ctgaccaa	ccgccagaag	gcgctcgccg	cccagcgata	3960
gcagttcttg	caaggaagca	aagtttttca	acggtttgag	accgtccgcc	gtaggcatgc	4020

```

ttttgagcgt ttgaccaagc agttccaggc ggtcccacag ctcggtcacc tgctctacgg 4080
catctcgatc cagcatatct cctcgtttcg cgggttgggg cggctttcgc tgtacggcag 4140
tagtcgggtg tcgtccagac gggccagggt catgtcttcc caccggcgca gggctcctcg 4200
cagcgtagtc tgggtcacgg tgaaggggtg cgctccgggc tgcgcgctgg ccagggtgcg 4260
cttgaggctg gtctgctgg tgctgaagcg ctgccggtct tcgccctgcg cgtcggccag 4320
gtagcatttg accatggtgt catagtccag cccctccgcg gcgtggccct tggcgcgag 4380
cttgcccttg gaggaggcgc cgcacgaggg gcagtgcaga cttttgaggg cgtagagctt 4440
gggcgcgaga aataccgatt ccggggagta ggcatccgcg ccgcaggccc cgcagacggg 4500
ctcgcatctc acgagccagg tgagctctgg ccgttcgggg tcaaaaacca ggtttcccc 4560
atgctttttg atgcgtttct tacctctggt ttccatgagc cgggtgtccac gctcggtgac 4620
gaaaaggctg tccgtgtccc cgtatacaga cttgagaggc ctgtcctcga ccgatgccct 4680
tgagagcctt caaccagtc agtccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccc 4740
cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg 4800
tcattttcgg cgaggaccgc ttctgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgccg 4860
tattcggaat cttgcacgcc ctcgctcaag ccttcgtcac tggccccgc accaaacgtt 4920
tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca tggcgccga cgcgctgggc tacgtcttgc 4980
tggcgttcgc gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttcggcg 5040
gcatcgggat gccgcggtt caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg 5100
gacagcttca aggatcgctc gcggtctta ccagcctaac ttcatcact ggaccgctga 5160
tcgtcacggc gatttatgcc gcctcgccga gcacatgga cgggttgga tggattgtag 5220
gcgcgcctc atacctgtc tgctccccg cgttgctcg cgggtgatgg agccgggcca 5280
cctcgacctg aatggaagcc ggccgacac cgctaacgga ttcaccact caagaattgg 5340
agccaatcaa ttcttgccga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatctc 5400
catcgcgctc gccatctcca gcagccgcac gcggcgcatc tcgggcagcg ttgggtcctg 5460
gccacgggtg cgcgatgatc tgctcctgtc gttgaggacc cggctaggct ggccggggtt 5520
ccttactggt tagcagaatg aatcacggat acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg 5580
caaaacgtct gcgacctgag caacaacatg aatggtcttc ggtttcgtg tttcgtaaa 5640
tctggaaacg cggaaagtcag cgcctgcac cattatgttc cggatctgca tcgcaggatg 5700
ctgctggcta cctgtggaa cacctacatc tgtattaacg aagcgctggc attgacctg 5760
agtgattttt ctctggtccc gccgcatcca taccgccagt tgtttaccct cacaacgttc 5820
cagtaaccgg gcattgtcat catcagtaac ccgtatcgtg agcatcctct ctcgtttcat 5880
cggtatcatt acccccatga acagaaattc ccccttacac ggaggcatca agtgacaaa 5940
caggaaaaaa ccgcccttaa catggcccg tttatcagaa gccagacatt aacgcttctg 6000
gagaaactca acgagctgga cgcggatgaa caggcagaca tctgtgaatc gcttcacgac 6060
cacgctgatg agctttaccg cagctgcctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaanaacct 6120
tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga 6180
caagcccgtc agggcgcgct agcgggtgtt ggccgggtgtc gggcgcgagc catgaccag 6240
tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc ttaactatgc ggcacagag cagattgtac 6300
tgagagtgca ccataatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca 6360
tcaggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcggt cggctgccc 6420
gagcggtatc agctcactca aaggcggtta tacggttatc cacagaatca ggggataacg 6480
caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgct 6540
tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa 6600
gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 6660
ccctcgctgc ctctcctgtt ccgacctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 6720
cttcgggaag cgtggcgctt tctcaatgct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg 6780
tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccagc cgtgcccct 6840
tatccggtaa ctatcgctctt ggtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag 6900

```



```

cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga 6960
agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga 7020
agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacia accaccgctg 7080
gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag 7140
aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag 7200
ggatttttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat 7260
gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaaacttg gtctgacagt taccaatgct 7320
taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac 7380
tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa 7440
tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttatc agcaataaac cagccagccg 7500
gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt 7560
gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca 7620
ttgctgcagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccgggt 7680
cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg gttagctcct 7740
tcggtcctcc gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg 7800
cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg 7860
agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgccccg 7920
cgtcaacacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa 7980
aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt 8040
aaccactcg tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt 8100
gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggat aagggcgaca cggaaatgtt 8160
gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca 8220
tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat 8280
ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata 8340
aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc ttcaagaatt gatccgggcc ccatttccc 8400
c
8401

```